

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2001年1月4日 (04.01.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/00173 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 9/127
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/04140
- (22) 国際出願日: 2000年6月23日 (23.06.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願平11/78142 1999年6月24日 (24.06.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和醗酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)
[JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (73) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 加藤泰己 (KATO,

Yasuki) [JP/JP]. 山内雅博 (YAMAUCHI, Masahiro) [JP/JP]. 草野宏子 (KUSANO, Hiroko) [JP/JP]. 石原淳 (ISHIHARA, Atsushi) [JP/JP]; 〒411-8731 静岡県駿東郡長泉町下土狩1188 協和醗酵工業株式会社 医薬総合研究所内 Shizuoka (JP).

- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーロパ特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続票有]

(54) Title: METHOD OF REGULATING LEAKAGE OF DRUG ENCAPSULATED IN LIPOSOMES

(54) 発明の名称: リポソームに内包された薬物の漏出抑制方法

(57) Abstract: A method of regulating the leakage of a drug encapsulated in liposomes by satisfying at least two of the following three requirements, i.e., using two or more bilayer lipid membranes of the liposomes, controlling the average particle diameter of the liposomes to 120 nm or more, and using, as the lipid constituting the liposomes, a lipid having a phase transition temperature higher than the bodily temperature; and a liposome preparation stable *in vivo* which satisfies at least two of the following three requirements, i.e., using two or more bilayer lipid membranes of the liposomes, adjusting the average particle diameter of the liposomes to 120 nm or more, and using, as the lipid constituting the liposomes, a lipid having a phase transition temperature higher than the bodily temperature.

(57) 要約:

リポソームの脂質二重膜の枚数を複数枚以上とすること、リポソームの平均粒子径を120nm以上とすること、およびリポソームを構成する脂質として相転移温度が生体内温度より高い脂質を使用することの3つから選ばれる2つ以上を満たすことにより、リポソームに内包された薬物の漏出抑制方法を提供する。また、リポソームの脂質二重膜の枚数が複数枚以上であること、リポソームの平均粒子径が120nm以上であること、およびリポソームを構成する脂質が相転移温度が生体内温度より高い脂質であることの3つから選ばれる2つ以上を満たす生体内で安定なリポソーム製剤を提供する。



WO 01/00173 A1



添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

リボソームに内包された薬物の漏出抑制方法

技術分野

本発明は、リボソームに内包された薬物の漏出抑制方法および生体内で安定なリボソーム製剤に関する。

背景技術

リボソームに薬物を内包させて薬物の効果を高める技術は、すでに医療現場で治療に使われており、臨床応用は主として注射により行われている。注射の中でもとりわけ血管内部に投与される場合、リボソームに内包された薬物が比較的長時間漏出することなくリボソーム内に存在することは、治療効果を高める上で重要である。

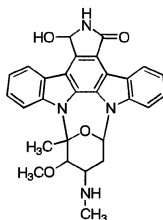
ビーは、抗腫瘍剤のリボソームからの漏出を抑制する方法を見出している（特許第2572554号公報）。これによると、リボソームの内外に帯電した物質の濃度勾配を作ることにより膜貫通ポテンシャルを発生させ、イオン化可能な薬物をpH勾配や Na^+/K^+ 濃度勾配でリボソーム内部に封入することにより、薬物がリボソームから漏出するのを抑制する。さらに、同様なpH勾配を利用して薬物をリボソームに内包し漏出を抑制する方法として、バレンホルツらは、硫酸アンモニウムを用いたアンモニウムイオン勾配により得られるリボソーム内外のpH勾配の利用を考案した（特許第2659136号公報）。いずれの方法においても、用いるリボソームの粒子径に関する制約はなく、該リボソームは、小さなユニラメラ小胞（Small Unilamellar Vesicle, SUV）、大きなユニラメラ小胞（Large Unilamellar Vesicle, LUV）、多重ラメラ小胞（Multilamellar Vesicle, MLV）などから構成されている。一方、マウラーらは、シプロフロキサシンを硫酸アンモニウムを用いたpH勾配を利用した方法で平均粒子径が190nmのLUVに内包したとき、50%マウス血清中、37℃の条件でシプロフロキサシンの漏出が速やかに起こることを報告している〔バイオキミカ・エト・バイオフィジカ・アクタ（Biochim. Biophys. Acta）, 1374, 9（1998）〕。彼ら

は、シプロフロキサシンはドキソルビシンなどとは異なり、リボソーム内部で結晶化（precipitation）していないため漏出が起きるとしている。このように、前述の二つの特許で示される方法は、リボソームに内包された薬物の漏出を考えた場合、必ずしも最良の方法とは言えず、さらなる改良が望まれている。

発明の開示

本発明の目的は、リボソームに内包された薬物の漏出抑制方法および生体内で安定なリボソーム製剤を提供することにある。

本発明者らは、UCN-01などのインドロカルバゾール誘導体をリボソーム化することにより生体内における安定性の向上などが図られることを見い出している（WO 97/48398）。



UCN-01

その後、鋭意検討を重ねたところ、リボソームの平均粒子径を120nm以上とする、あるいは脂質二重膜の層の枚数を複数枚以上することにより、薬物漏出を効率良く抑制できることを見い出した。また、脂質二重膜の構成成分に相転移温度の高い成分を併用することにより薬物の漏出を抑制できることを見い出した。

すなわち、本発明は、リボソームの脂質二重膜の枚数を複数枚以上とすることと特徴とする、生体成分存在下でのリボソームに内包された薬物の漏出抑制方法、またはリボソームを構成する脂質として相転移温度が生体内温度より高い脂質を使用することを特徴とする、生体成分存在下でのリボソームに内包さ

れた薬物の漏出抑制方法に関する。

また、本発明は、リボソームの脂質二重膜の枚数を複数枚以上とすること、リボソームの平均粒子径を120nm以上とすること、およびリボソームを構成する脂質として相転移温度が生体内温度より高い脂質を使用することの3つから選ばれる2つ以上を満たすことを特徴とする、生体成分存在下でのリボソームに内包された薬物の漏出抑制方法に関する。

また、本発明は、リボソームの脂質二重膜の枚数を複数枚以上とし、リボソームの平均粒子径を120nm以上とすることの特徴とする、生体成分存在下でのリボソームに内包された薬物の漏出抑制方法に関する。

また、本発明により、リボソームの脂質二重膜の枚数が複数枚以上であり、かつリボソームの平均粒子径が120nm以上であるリボソーム製剤、リボソームの脂質二重膜の枚数が複数枚以上であり、かつリボソームを構成する脂質が相転移温度が生体内温度より高い脂質であるリボソーム製剤、またはリボソームの平均粒子径が120nm以上であり、かつリボソームを構成する脂質が相転移温度が生体内温度より高い脂質であるリボソーム製剤が提供される。

さらに、本発明により、リボソームの脂質二重膜の枚数が複数枚以上であること、リボソームの平均粒子径が120nm以上であること、およびリボソームを構成する脂質が相転移温度が生体内温度より高い脂質であることの3つから選ばれる2つ以上を満たすリボソーム製剤が提供される。

上記各リボソーム製剤により、生体成分存在下でリボソームに内包された薬物の漏出が抑制される。

リボソームを構成する脂質としては、例えばリン脂質、グリセロ糖脂質、スフィンゴ糖脂質、コレステロールなどが用いられ、特にリン脂質が好ましく用いられる。これらの中でも、相転移温度が生体内温度(35~37℃)より高いものが好ましい。これらの脂質は、ポリソルベート80、プルロニックF68などの非イオン性界面活性剤、塩化ベンザルコニウムなどのカチオン性界面活性剤、ラウリル硫酸ナトリウムなどのアニオン性界面活性剤、デキストランなどの多糖類もしくはその誘導体、ポリオキシエチレンラウリルアルコール、ポリエチレングリコールなどのポリオキシエチレン誘導体などにより改質されていてもよい。

リン脂質としては、例えばホスファチジルコリン（大豆ホスファチジルコリン、卵黄ホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、ジバルミトイルホスファチジルコリンなど）、ホスファチジルエタノールアミン（ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン、ジバルミトイルホスファチジルエタノールアミンなど）、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジイノシトール、リゾホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、ポリエチレングリコール修飾リン脂質、卵黄レシチン、大豆レシチン、水素添加リン脂質などの天然または合成のリン脂質などがあげられ、これらのうち相転移温度が生体内温度（35～37℃）より高いもの（例えばジステアロイルホスファチジルコリン、ジバルミトイルホスファチジルエタノールアミン、N-ステアロイルスフィンゴミエリンなど）が好ましい。

グリセロ糖脂質としては、例えばスルホキシリボシルグリセリド、ジグリコシルジグリセリド、ジガラクトシルジグリセリド、ガラクトシルジグリセリド、グリコシルジグリセリドなどがあげられ、これらのうち相転移温度が生体内温度（35～37℃）より高いもの（例えば1, 2-O-ジバルミトイル-3-O-β-D-グルクロノシル-s n-グリセロール、1, 2-O-ジステアロイル-3-O-β-D-グルクロノシル-s n-グリセロールなど）が好ましい。

また、スフィンゴ糖脂質としては、例えばガラクトシルセブレロシド、ラクトシルセブレロシド、ガングリオシドなどがあげられ、これらのうち相転移温度が生体内温度（35～37℃）より高いもの（例えばN-ステアロイルジヒドロガラクトシルスフィンゴシン、N-ステアロイルジヒドロラクトシルスフィンゴシンなど）が好ましい。

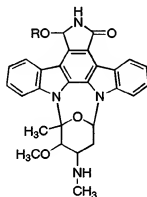
これらは、単独あるいは組み合わせて用いられる。組み合わせて用いる場合、例えば、水素添加大豆ホスファチジルコリン、ポリエチレングリコール修飾リン脂質およびコレステロールから選ばれる少なくとも二成分以上からなる脂質、ジステアロイルホスファチジルコリン、ポリエチレングリコール修飾リン脂質およびコレステロールから選ばれる少なくとも二成分以上からなる脂質などが、脂質として用いられる。ここで、ポリエチレングリコール修飾リン脂質

におけるリン脂質としては、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミンなどのホスファチジルエタノールアミンが好ましく用いられる。

また必要に応じて、脂質成分と共に、膜安定化剤としてコレステロールなどのステロール類など、抗酸化剤としてトコフェロールなど、荷電物質としてステアリルアミン、ジセチルホスフェート、ガンリオシドなどを用いてもよい。

リボソームに内包される薬物としては、例えばインドロカルバゾール誘導体、制癌剤、抗生物質、抗真菌剤、薬理学的活性を有する物質などがあげられる。

インドロカルバゾール誘導体としては、例えばUCN-01およびその誘導体など（例えば下記化合物）があげられる。



（式中、Rは水素または低級アルキルを表す）

Rの定義における低級アルキルは、直鎖もしくは分枝状の炭素数1～6のアルキル、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシルなどを意味する。

制癌剤としては、例えばアクチノマイシンD、マイトマイシンC、クロモマイシン、ドキシソルピシン、エビルピシン、ピノレリピン、ダウノルビシン、アクラルビシン、ブレオマイシン、ペプロマイシン、ピンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン、エトポサイド、メソトレキセート、5-Fu、テガフル、シタラビン、エノシタビン、アンシタビン、タキソール、タキソテール、シスプラチン、シトシンアラビノシド、イリノテカン、およびこれらの誘導体などがあげられる。

抗生物質としては、例えばミノサイクリン、テトラサイクリン、ヒペラシリンナトリウム、トシル酸スルタミシリン、アモキシシリン、アンピシリン、バカンピシリン、アスポシシリン、セフジニル、フロモキシセフナトリウム、セフォチアム、セフカベンピボキシル、セファクロル、セフトレンピボシル、セファゾリンナトリウム、セフォゾラン、クラリスロマイシン、クリンダマイシン、エリスロマイシン、レボフロキサシン、トシル酸トスフロキサシン、オフロキサシン、シプロフロキサシン、アルベカシン、イセバマイシン、ジベカシン、アミカシン、ゲンタミシン、バンコマイシン、ホスホマイシン、およびこれらの誘導体などがあげられる。

抗真菌剤としては、例えばフルコナゾール、イトラコナゾール、テルビナフィン、アムホテリシンB、ミコナゾール、およびこれらの誘導体などがあげられる。

薬理的活性を有する物質としては、例えばホルモン、酵素、蛋白、ペプチド、アミノ酸、核酸、遺伝子、ビタミン類、糖類、脂質、合成医薬品などがあげられる。

生体成分としては、例えば血液成分などがあげられる。

次に、本発明のリボソーム製剤の製造方法について説明する。

本発明のリボソーム製剤の製造には、公知のリボソーム製剤の調製方法が適用できる。公知のリボソーム製剤の調製方法としては、例えばバンハム (B a n g h a m) らのリボソーム調製法〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 13, 238 (1965)〕、エタノール注入法〔ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー (J. Cell. Biol.), 66, 621 (1975)〕、フレンチプレス法〔フェブス・レター (FEBS Lett.) 99, 210 (1979)〕、凍結融解法〔アーカイブス・オブ・バイオケミストリー・アンド・バイオフィジックス (Arch. Biochem. Biophys.), 212, 186 (1981)〕、逆相蒸発法〔プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユー・エス・エー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A), 75, 4194 (1978)〕、pH勾配法 (特許第2572554号公報、特許第2659136号公報など) などがあげられる。

pH勾配法は、リボソームへの薬物の内包率が高いこと、リボソーム懸濁液中の残留有機溶媒が少ないことなどの利点が多い。例えば、脂質をエタノールなどの溶媒に溶解後、なす型フラスコに入れ、減圧下溶媒留去し、脂質薄膜を形成する。次いで、酸性緩衝液（例えばクエン酸緩衝液）を加えて振とうし、大きなMLVを形成する。さらに、エクストルージョン法などにより、リボソームの平均粒子径を調製する（例えば130 nm）。このリボソーム懸濁液にUCN-01などの薬物の弱酸性液を添加後、適当なpH調整剤（例えば水酸化ナトリウム水溶液）を加え、リボソーム懸濁液のpHを中性付近まで上昇（リボソーム懸濁液のpH上昇前とpH上昇後のpHの差は3以上が望ましい）させる。以上の操作により、リボソーム内部に薬物を定量的に包含させることができる。

また、非イオン性界面活性剤、カチオン性界面活性剤、アニオン性界面活性剤、多糖類およびその誘導体、ポリオキシエチレン誘導体などによるリボソーム表面改質も任意に行うことができる〔Stealth Liposomes, ed. by D. D. Lasic and F. Martin, CRC Press Inc., Florida, pp. 93-102, 1995年〕。さらに、ターゲッティングに応用するため、抗体、蛋白、ペプチド、脂肪酸類などによるリボソーム表面修飾を行うこともできる〔Stealth Liposomes, ed. by D. D. Lasic and F. Martin, CRC Press Inc., Florida, pp. 93-102, 1995年〕。

リボソームを懸濁させる溶液としては、水以外に酸、アルカリ、種々の緩衝液、生理的食塩液、アミノ酸輸液などを用いてもよい。また、クエン酸、アスコルビン酸、システイン、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）などの抗酸化剤をリボソーム懸濁液に添加してもよい。また、等張化剤として、例えば、グリセリン、ブドウ糖、塩化ナトリウムなどの添加も可能である。

また、薬物と脂質とをエタノールなどの有機溶媒に溶解し、溶媒留去した後、生理食塩水などを添加、振とう攪拌し、リボソームを形成させることもできる。

リボソームの平均粒子径は、120 nm以上であることが好ましく、120

～500nmであることがさらに好ましい。平均粒子径を調節する方法としては、上述のエクストルージョン法などがあげられる。

脂質二重膜の枚数を複数枚以上とする方法としては、0.2 μ m、0.4 μ mあるいはそれ以上の大きめの孔を有するメンブランフィルターを用いたエクストルージョン法、大きなMLVを機械的に粉碎（マントングウウリン、マイクロフルイダイザーなどを使用）する方法〔R. H. Muller, S. Benita, B. Bohm編著, “Emulsion and Nanosuspensions for the Formulation of Poorly Soluble Drugs”, High-Pressure Homogenization Techniques for the Production of Liposome Dispersions: Potential and Limitations, M. Brandl, pp. 267-294, 1998 (Scientific Publishers Stuttgart, Germany)〕などがあげられる。

上記の方法などにより得られるリポソーム製剤は、そのままでも使用できるが、使用目的、保存条件などにより、マンニトール、ラクトース、グリシンなどの賦形剤を加えて凍結乾燥することもできる。また、グリセリンなどの凍結保存剤を加えて凍結保存してもよい。

本発明で得られるリポソーム製剤は、注射剤として用いるのが一般的であるが、経口剤、点鼻剤、点眼剤、経皮剤、坐剤、吸入剤などとして加工して使用することもできる。

本発明で得られるリポソーム製剤は、生体成分中、例えば血液成分中での薬物の安定化、副作用の低減および腫瘍への集積性の増大を目的としている。

次に、試験例により、本発明の効果について説明する。

試験例 1

ヒトAGP添加ラットブラズマ中（ヒトAGP 0.5mg/mL）におけるリポソーム内に包含したUCN-01の経時的な漏出を調べるため、実施例1～4および比較例1～3で調製したUCN-01包含リポソーム懸濁液0.1mLに蒸留水0.9mLを加えて混合した。この液0.05mLにヒトAG

Pを0.5 mg/mL添加したラットプラズマ4.95 mLを加えて混合し、試料液とした。混合直後、および37℃で3時間保存した後、試料液2 mLをゲル濾過 (Sephacrose CL-6B、φ20mm×20cm、移動相：PBS (リン酸緩衝食塩水)、試料添加量：2 mL、フラクション採取量：約4 mL) した。リボソーム画分と蛋白画分を分離し、溶出液0.4 mL当たり2-プロパノールを0.8 mL加えて振とうした。その後、4℃下、12,000g×10分の遠心分離を行い、上清20 μLを下記の条件で高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析した。

HPLC分析条件

カラム：YMC-Pack ODS-AM AM-312 150mm×6mm (YMC)

移動相：0.1%トリエチルアミン添加0.05 mol/Lリン酸緩衝液 (pH 7.3) : アセトニトリル=1容量部 : 1容量部

流速：1.0 mL/分

カラム保持温度：25℃

検出：励起波長310 nm、蛍光波長410 nm

リボソーム中のUCN-01残存率は、まず、リボソーム画分中のUCN-01含有率を求め、ゲル濾過の回収 (リボソーム画分中と蛋白画分中のUCN-01の合計) 率 $[(A+B)/C]$ で補正することにより、下記の式により算出した。

リボソーム画分中のUCN-01含有率 (%) = $(A/C) \times 100$

蛋白画分中のUCN-01含有率 (%) = $(B/C) \times 100$

A : リボソーム画分中のUCN-01量

B : 蛋白画分中のUCN-01量

C : ゲル濾過に供したリボソーム懸濁液中のUCN-01量

リボソーム中のUCN-01残存率(%)

$$= [\text{リボソーム画分中のUCN-01含有率}(\%) / \text{ゲル濾過の回収率}(\%)] \times 100$$

結果を表1に示す。

表1 リボソーム中のUCN-01残存率

		UCN-01 残存率(%)
実施例1	混合直後	95
	3時間後	80
実施例2	混合直後	91
	3時間後	57
実施例3	混合直後	94
	3時間後	63
実施例4	混合直後	99
	3時間後	81
比較例1	混合直後	90
	3時間後	37
比較例2	混合直後	23
	3時間後	0
比較例3	混合直後	93
	3時間後	5

以下に、本発明の実施例および比較例を示す。

発明を実施するための最良の形態

実施例1

5gの水素添加大豆ホスファチジルコリン〔相転移温度：58℃〔FEBS Lett., 386, 247-251(1996)〕〕に、25mLの100mmol/Lクエン酸緩衝液(pH4.0)を加え、ボルテックスミキサーで

振とう攪拌した。この懸濁液を、70℃で0.4μmのポリカーボネートメンブランフィルターを10回通過させた。これに100mmol/Lのクエン酸緩衝液を加え、水素添加大豆ホスファチジルコリンの濃度が62.5mg/mLのリボソーム懸濁液となるよう調製した。一方、10mgのUCN-01を量り取り、先に調製したリボソーム懸濁液8mLを添加した。さらに、1mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液を適量添加してpHを8にした後、蒸留水を加えて全量を10mLとした。70℃で5分間加熱し、UCN-01をリボソーム内に包含した。

動的光散乱 (DLS) [A model DLS-700、Otsuka Electronics Ltd. (DLS-700、大塚電子)、以下同様] でリボソームの平均粒子径を測定したところ、186nmであった。

実施例2

5gの水素添加大豆ホスファチジルコリン {相転移温度: 58℃ [FEBS Lett., 386, 247-251 (1996)]} に、25mLの100mmol/Lのクエン酸緩衝液 (pH4.0) を加え、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を、70℃で0.4μmのポリカーボネートメンブランフィルターを2回通過させた。さらに70℃で0.2μmのポリカーボネートメンブランフィルターを10回通過させた。これに100mmol/Lのクエン酸緩衝液を加え、水素添加大豆ホスファチジルコリンの濃度が62.5mg/mLのリボソーム懸濁液を調製した。一方、10mgのUCN-01を量り取り、先に調製したリボソーム懸濁液8mLを添加した。さらに、1mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液を適量添加してpHを8にした後、蒸留水を加えて全量を10mLとした。70℃で5分間加熱し、UCN-01をリボソーム内に包含した。

DLSでリボソームの平均粒子径を測定したところ、130nmであった。

実施例3

実施例2で調製したUCN-01を含むリボソーム懸濁液5mLに、1.25g/mLの濃度のPEG-DSPE [1, 2-ジステアロイル-sn-グリ

セロ-3-ホスファチジルエタノールアミン-N-（ポリエチレングリコール 2000）；Avanti製]のエタノール溶液を0.05mL添加した後、70℃で2分間加熱し、リボソーム表面をポリエチレングリコール（PEG）で被覆した。

DLSでリボソームの平均粒子径を測定したところ、136nmであった。

実施例4

0.7gのジステアロイルホスファチジルコリン〔DSPC、相転移温度：58℃および56℃（野島庄七他編、リボソーム、p.77、1988年、南江堂）〕に、約5mLの100mmol/Lクエン酸緩衝液（pH4.0）を加え、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を、70℃で0.4μmのポリカーボネートメンブランフィルターを10回通過させた。さらに、70℃で0.2μmのポリカーボネートメンブランフィルターを10回通過させた。これに100mmol/Lのクエン酸緩衝液を加え、DSPCの濃度が62.5mg/mLのリボソーム懸濁液となるよう調製した。一方、5mgのUCN-01を量り取り、先に調製したリボソーム懸濁液4mLを添加した。さらに、1mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液を適量添加してpHを8にした後、蒸留水を加えて全量を5mLとした。70℃で5分間加熱し、UCN-01をリボソーム内に包含した。

DLSでリボソームの平均粒子径を測定したところ、180nmであった。

比較例1

20gの水素添加大豆ホスファチジルコリン〔相転移温度：58℃〔FEB S Lett., 386, 247-251（1996）〕〕に、70mLの100mmol/Lクエン酸緩衝液（pH4.0）を加え、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を、70℃で0.4μmのポリカーボネートメンブランフィルターを4回通過させた。さらに70℃で0.1μmのポリカーボネートメンブランフィルターを10回通過させた。これに100mmol/Lのクエン酸緩衝液を加え、水素添加大豆ホスファチジルコリンの濃度が62.5mg/mLのリボソーム懸濁液となるよう調製した。一方、20mgのUCN-01

を量り取り、先に調製したリボソーム懸濁液 1.6 mL を添加した。さらに、 1 mol/L の水酸化ナトリウム水溶液を添加して pH を 8 にした後、蒸留水を加えて全量を 2.0 mL とした。70℃で 5 分間加熱し、UCN-01 をリボソーム内に包含した。これを氷で冷却した後、UCN-01 を含むリボソーム懸濁液 1.6 mL を取り、これに蒸留水 6.4 mL を加えた。超速心分離操作 (25℃、110,000 $\text{g} \times 1$ 時間) を行い、上清 6.7 mL を除去した後、蒸留水を加えて UCN-01 の濃度が 1 mg/mL となるよう再懸濁した。

DLS でリボソームの平均粒子径を測定したところ、109 nm であった。

比較例 2

15 g の卵黄ホスファチジルコリン [Egg PC、相転移温度: -15 ~ -7℃ (野島庄七他編、リボソーム、p. 77、1988 年、南江堂)] に、75 mL の 100 mmol/L クエン酸緩衝液 (pH 4.0) を加え、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を、室温で $0.4 \mu\text{m}$ のポリカーボネートメンブランフィルターを 10 回通過させた。これに 100 mmol/L のクエン酸緩衝液を加え、Egg PC の濃度が 62.5 mg/mL のリボソーム懸濁液となるよう調製した。一方、5 mg の UCN-01 を量り取り、先に調製したリボソーム懸濁液 4 mL を添加した。さらに、 1 mol/L の水酸化ナトリウム水溶液を適量添加して pH を 8 にした後、蒸留水を加えて全量を 5 mL とした。室温で、UCN-01 をリボソーム内に包含した。

DLS でリボソームの平均粒子径を測定したところ、274 nm であった。

比較例 3

1. 1 g のジパルミトイルホスファチジルコリン [DPPC、相転移温度: 41℃および 35℃ (野島庄七他編、リボソーム、p. 77、1988 年、南江堂)] に、約 7 mL の 100 mmol/L クエン酸緩衝液 (pH 4.0) を加え、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を、55℃で $0.4 \mu\text{m}$ のポリカーボネートメンブランフィルターを 15 回通過させた。さらに、55℃で $0.2 \mu\text{m}$ のポリカーボネートメンブランフィルターを 10 回通過させた。これに 100 mmol/L のクエン酸緩衝液を加え、DPPC の濃度が 6

2. 5 mg/mLのリボソーム懸濁液となるよう調製した。一方、5 mgのUCN-01を量り取り、先に調製したリボソーム懸濁液4 mLを添加した。さらに、1 mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液を適量添加してpHを8にした後、蒸留水を加えて全量を5 mLとした。55°Cで5分間加熱し、UCN-01をリボソーム内に包含した。

DLSでリボソームの平均粒子径を測定したところ、179 nmであった。

産業上の利用可能性

本発明により、リボソームに内包された薬物の漏出抑制方法および生体内で安定なリボソーム製剤が提供される。

請求の範囲

１． リボソームの脂質二重膜の枚数を複数枚以上とすることを特徴とする、生体成分存在下でのリボソームに内包された薬物の漏出抑制方法。

２． リボソームを構成する脂質として相転移温度が生体内温度より高い脂質を使用することを特徴とする、生体成分存在下でのリボソームに内包された薬物の漏出抑制方法。

３． リボソームの脂質二重膜の枚数を複数枚以上とすること、リボソームの平均粒子径を１２０ｎｍ以上にすること、およびリボソームを構成する脂質として相転移温度が生体内温度より高い脂質を使用することの３つから選ばれる２つ以上を満たすことを特徴とする、生体成分存在下でのリボソームに内包された薬物の漏出抑制方法。

４． 脂質が水素添加大豆ホスファチジルコリン、ポリエチレングリコール修飾リン脂質およびコレステロールから選ばれる少なくとも一成分以上からなる請求の範囲２または３に記載の漏出抑制方法。

５． 脂質がジステアロイルホスファチジルコリン、ポリエチレングリコール修飾リン脂質およびコレステロールから選ばれる少なくとも一成分以上からなる請求の範囲２または３に記載の漏出抑制方法。

６． リボソームの脂質二重膜の枚数を複数枚以上とし、リボソームの平均粒子径を１２０ｎｍ以上にすることを特徴とする、生体成分存在下でのリボソームに内包された薬物の漏出抑制方法。

７． リボソームの平均粒子径が１２０～５００ｎｍである請求の範囲３または６に記載の漏出抑制方法。

８． 生体成分が血液成分である請求の範囲１～７のいずれかに記載の漏出抑制方法。

９． 内包される薬物がインドロカルバゾール誘導体である請求の範囲１～８のいずれかに記載の漏出抑制方法。

１０． 内包される薬物が制癌剤である請求の範囲１～８のいずれかに記載の漏出抑制方法。

１１． 内包される薬物が抗生物質である請求の範囲１～８のいずれかに

記載の漏出抑制方法。

12. 内包される薬物が薬理学的活性を有する物質である請求の範囲1～8のいずれかに記載の漏出抑制方法。

13. リボソームの脂質二重膜の枚数が複数枚以上であり、かつリボソームの平均粒子径が120nm以上であるリボソーム製剤。

14. リボソームの脂質二重膜の枚数が複数枚以上であり、かつリボソームを構成する脂質が相転移温度が生体内温度より高い脂質であるリボソーム製剤。

15. リボソームの平均粒子径が120nm以上であり、かつリボソームを構成する脂質が相転移温度が生体内温度より高い脂質であるリボソーム製剤。

16. リボソームの脂質二重膜の枚数が複数枚以上であること、リボソームの平均粒子径が120nm以上であること、およびリボソームを構成する脂質が相転移温度が生体内温度より高い脂質であることの3つから選ばれる2つ以上を満たすリボソーム製剤。

17. 生体成分存在下でリボソームに内包された薬物の漏出を抑制する請求の範囲13～16のいずれかに記載のリボソーム製剤。

18. 生体成分が血液成分である請求の範囲17に記載のリボソーム製剤。

19. 脂質が水素添加大豆ホスファチジルコリン、ポリエチレングリコール修飾リン脂質およびコレステロールから選ばれる少なくとも一成分以上からなる請求の範囲14～18のいずれかに記載のリボソーム製剤。

20. 脂質がジステアロイルホスファチジルコリン、ポリエチレングリコール修飾リン脂質およびコレステロールから選ばれる少なくとも一成分以上からなる請求の範囲14～18のいずれかに記載のリボソーム製剤。

21. リボソームの平均粒子径が120～500nmである請求の範囲13、15～18のいずれかに記載のリボソーム製剤。

22. 内包される薬物がインドロカルバゾール誘導体である請求の範囲13～21のいずれかに記載のリボソーム製剤。

23. 内包される薬物が制癌剤である請求の範囲13～21のいずれか

に記載のリボソーム製剤。

24. 内包される薬物が抗生物質である請求の範囲13～21のいずれかに記載のリボソーム製剤。

25. 内包される薬物が薬理学的活性を有する物質である請求の範囲13～21のいずれかに記載のリボソーム製剤。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04140

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int. Cl.⁷ A61K9/127

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int. Cl.⁷ A61K9/127

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 97/03652, A1 (DEPOTECH CORPORATION), 06 February, 1997 (06.02.97), Full text	1
Y	& JP, 11-508900, A & US, 5931809, A	3-14, 16-25
X	JP, 8-59503, A (Teijin Limited), 05 March, 1996 (05.03.96), Full text (Family: none)	1
Y		3-14, 16-25
X	EP, 451791, A2 (HOECHST AKTIENGESSELLSCHAFT), 16 October, 1991 (16.10.91), Full text	2
Y	& JP, 4-234820, A	3-12, 14-25
Y	JP, 2-86841, A (TERUMO CORPORATION), 27 March, 1990 (27.03.90), page 2, lower right column (Family: none)	3-13, 15-25
Y	JP, 7-41432, A (Teijin Limited), 10 February, 1995 (10.02.95), Par. No. [0020] (Family: none)	3-13, 15-25

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
08 September, 2000 (08.09.00)

Date of mailing of the international search report
19 September, 2000 (19.09.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04140

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP, 850646, A1 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.), 01 July, 1998 (01.07.98), Full text & WO, 97/48398, A1	9,22

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. A61K9/127	
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. A61K9/127	
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの	
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAPLUS (STN)	
C. 関連すると認められる文献	
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 関連する 請求の範囲の番号
X / Y	WO, 97/03652, A1 (DEPOTEC CORPORATION) 6. 2月. 1997 (06. 02. 97) 全文 & JP, 11-508900, A & US, 5931809, A 1 / 3-14, 16-25
X / Y	JP, 8-59503, A (帝人株式会社) 5. 3月. 1996 (05. 03. 96) 全文 (ファミリーなし) 1 / 3-14, 16-25
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリ 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 08. 09. 00	国際調査報告の送付日 19.09.00
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 森井 隆信 電話番号 03-3581-1101 内線 6460

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X / Y	EP, 451791, A2 (HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT) 16. 10月. 1991 (16. 10. 91) 全文 & JP, 4-234820, A	2 / 3-12, 14-25
Y	JP, 2-86841, A (テルモ株式会社) 27. 3月. 1990 (27. 03. 90) 第2頁右下欄 (ファミリーなし)	3-13, 15-25
Y	JP, 7-41432, A (帝人株式会社) 10. 2月. 1995 (10. 02. 95) 第【0020】段落 (ファミリーなし)	3-13, 15-25
Y	EP, 850646, A1 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) 1. 7月. 1998 (01. 07. 98) 全文 & WO, 97/48398, A1	9, 22